家蚕中肠特异启动子 *P56* 的克隆及活性分析*

王嘉祯[1] 姚伦广[1] 王峰[2] 阚云超[1] 罗金萍[1] 黄倩倩[1] 段建平[1**]

[1]南阳师范学院河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室 南阳 473061

[2]西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室 重庆 400716

*国家自然科学基金(31501900)，河南省高校重点科研项目(16A180032)，河南省昆虫生物反应器创新团队支持计划(C20140047)，南阳师范学院 STP 项目(17386).

**通讯作者，电子邮箱 djping8199@nynu.edu.cn

摘要 中肠是家蚕的消化器官，也是抵御外界病源入侵的生理屏障。为克隆和鉴定新的家蚕中肠特异启动子，首先利用 RT-PCR 检测家蚕组织特异表达候选基因 *BmP56* 的表达特性，发现其只在中肠组织表达。进一步克隆该基因上游调控序列 *P56*，构建由该序列驱动红色荧光蛋白基因 *DsRed* 表达的转基因载体 pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP]，经显微注射和荧光筛选获得转基因家蚕。表达分析显示，报告基因 *DsRed* 只在转基因家蚕中肠组织表达，与 *BmP56* 的表达特征一致，说明克隆的上游调控序列 *P56* 是有活性的家蚕中肠特异启动子。

关键词 家蚕 中肠 特异启动子 转基因

Cloning and activity analysis of a midgut-specific promoter in silkworm (*Bombyx mori*)

Wang Jia-zhen[1] Yao Lun-guang[1] Wang Feng[2] Kan Yun-chao[1] Luo Jin-ping[1] Huang Qian-qian[1] Duan Jian-ping [1**]

（*1 Henan Provincial Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang* 473061, *China*）

（2 *State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing* 400716, *China*）

Abstract The midgut is not only a digestive organ, but also a physiological barrier against invasive pathogens in silkworm, *Bombyx mori*. To clone and identify a novel midgut-specific promoter in silkworm, we first detected the expression characteristics of a candidate gene *BmP56* of tissue-specific expression by RT-PCR, and found that it midgut-specifically expressed. Furthermore, we cloned its upstream regulatory region *P56*, and constructed a transgenic vector pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP] of the expression of red fluorescence protein gene *DsRed* drived by the upstream regulatory region *P56*. By the way of microinjection and fluorescence screening, we finally obtained the transgenic silkworm. The expression detection showed that the reporter gene *DsRed* only expressed in the midgut of transgenic silkworm, in consistent with the expression mode of *BmP56*, indicating that the upstream regulatory region *P56* is an active, midgut-specifcally expressed promoter in silkworm.

Key words *Bombyx mori* midgut specific promoter transgene

家蚕（*Bombyx mori*)是重要经济昆虫，蚕病每年都会引起养蚕业很大经济损失。中肠是家蚕的消化器官，也是病原入侵蚕体的一道生理屏障，陆改、蒋亮等人将家蚕中肠特异启动子 *BmAPN* 和 *P2* 与家蚕免疫抗性研究相结合[1-7]，为借助启动子选育高抗病蚕品种提供了参考。

为克隆新的家蚕中肠特异启动子，本研究在进一步分析家蚕基因芯片数据[8]的基础上，利用 PCR 和转基因技术鉴定家蚕中肠特异表达候选基因 *BmP56* 的上游调控序列 *P56*，以期获得新的中肠特异启动子。功能注释 *BmP56* 是一个编码几丁质去乙酰化酶的基因，钟晓武等人曾通过蛋白质谱在家蚕中肠围食膜中鉴定到几个几丁质去乙酰化酶[9,10]，家蚕中该酶的启动子还未见报道。上游调控序列 *P56* 的鉴定，可为家蚕免疫应答和抗病育种研究提供新的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕品种为大造 P50。质粒 pBac[3×P3DsRed]、pBac[3×P3EGFP]和辅助质粒由本实验室保存或构建。*Asc* Ⅰ购自 NEB，LA *Taq*、*Nco* Ⅰ和 *Bam*HⅠ购自宝生物工程有限公司，pEASY-T1simple、TransZol Up Plus RNA Kit、TransScript II One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 购自 TransGen Biotech。家蚕基因组数据和基因芯片数据源自 SilkDB 数据库（http://silkworm.genomics.org.cn/）[11,12]。

1.2 方法

1.2.1 *BmP56* 基因的组织表达特征分析

抽提家蚕各组织 RNA，反转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板，利用引物 BmP56-F 和 BmP56-R（表 1）进行 PCR 扩增，检测 *BmP56* 基因在家蚕各组织中的表达情况。

表 1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

Primer type	Primer name	Primer sequence（5'-3'）
Primers for expression analysis of *BmP56*	BmP56-F	CCTGGAGGATTACGAG
	BmP56-R	TTACTGTCCAAGCGGATTTCCTACC
Primers for upstream sequence of *BmP56*	P56-F1	CCATGGATTTCCGCCGTGAAGCAG
	P56-R1	GGATCCGCGATATTCGGAATCTTTG
Primers for upstream regulatory sequence of *BmP56*	P56-F2	GGCGCGCCAGGGTGGGGTAGCCGTTGTAAC
	P56-R2	CGTTCTTGGAGGAGCGCACCATCGCGATATTCGGAATCTTTGATCG
Primers for DsRedSV40 fragment	DsRedSV40-F	GATTCCGAATATCGCGATGGTGCGCTCCTCCAAGAACG
	DsRedSV40-R	CTAGGCGCGCCGTACGCGTATCG
Primer for expression analysis of *DsRed*	SV40-R	CCTCTACAAATGTGGTATGGC

1.2.2 克隆 *BmP56* 的上游调控序列 *P56*

提取家蚕基因组 DNA，以基因组 DNA 为模板，利用上下游引物 P56-F1 和 P56-R1 进行 PCR 扩增，扩增条件为：94℃预变性 4min，94℃变性 30s、52℃退火 30s、72℃延伸 2min 共 30 个循环，72℃终延伸 10min，4℃保存。PCR 产物经切胶回收，与 pEASY-T1simple 连接，克隆并测序验证。以此 T 克隆质粒为模板，用引物 P56-F2 和 P56-R2 扩增 *P56* 片段，回收备用。

1.2.3 转基因载体的构建

设计 DsRedSV40 片段特异引物 DsRedSV40-F 和 DsRedSV40-R，以 pBac[3×P3DsRed]质粒为模板，进行 PCR 扩增，PCR 条件为：94℃预变性 3min，94℃变性 30s、53℃退火 30s、72℃延伸 1min 共 30 个循环，72℃终延伸 10min，4℃保存。将

PCR 产物进行凝胶回收。

将 *P56* 和 DsRedSV40 回收产物混合作为模板，利用引物 P56-F 和 DsRedSV40-R 进行搭桥 PCR，PCR 条件为：94℃预变性 3min，94℃变性 30s、50℃退火 1min、72℃延伸 3min 共 35 个循环，72℃终延伸 10min，4℃保存。PCR 产物经切胶回收后与 pEASY-T1simple 载体进行连接，获得 T-P56DsRedSV40。

用 *Asc* Ⅰ酶切 T-P56DsRedSV40 质粒，回收 P56DsRedSV40 片段，与经同样酶切并去磷酸化处理的载体 pBac[3×P3EGFP]进行连接，构建 pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP] 转基因载体（图 1）。

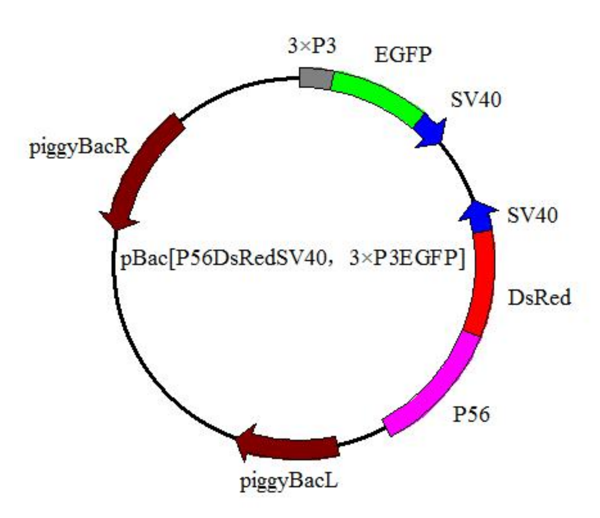


图 1　pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP]转基因表达载体示意图

Fig. 1　Schematic diagram of the transgenic vector pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP]

1.2.4　显微注射及荧光筛选

提取 pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP]质粒，与辅助质粒以 1：1 摩尔比混合，显微注射家蚕早期胚胎[13]。将处理后的蚕卵于标准条件下催青直至孵化。孵化的蚁蚕（G0 代）正常状态下饲养至化蛾，使蚕蛾交配产卵，获得 G1 代蛾圈。获得的 G1 代蛾圈置于荧光显微镜下观察，选择阳性个体进一步饲养并观察。

1.2.5　*DsRed* 的表达检测

在 5 龄中期时，取转基因家蚕及非转基因家蚕的中肠组织及非中肠组织，液氮冷冻，依照 TransZol Up Plus RNA Kit 说明书分别提取 RNA。将 RNA 反转录合成 cDNA，利用引物 DsRedSV40-F 和 SV40-R (见表 1)进行 PCR 扩增，扩增条件为：94℃预变性 3min，94℃变性 30s、55℃退火 30s、72℃延伸 1min 共 30 个循环，72℃终延伸 10min，4℃保存。

2 结果与分析

2.1 中肠特异表达基因的鉴定

前期分析家蚕基因芯片数据[8]时，发现 *BmP56* 是 1 个组织特异高表达候选基因（图 2）。进一步，分析该基因在家蚕 5 龄 3 天各组织中的表达情况时，发现该基因只在中肠组织中有表达（图 3）。

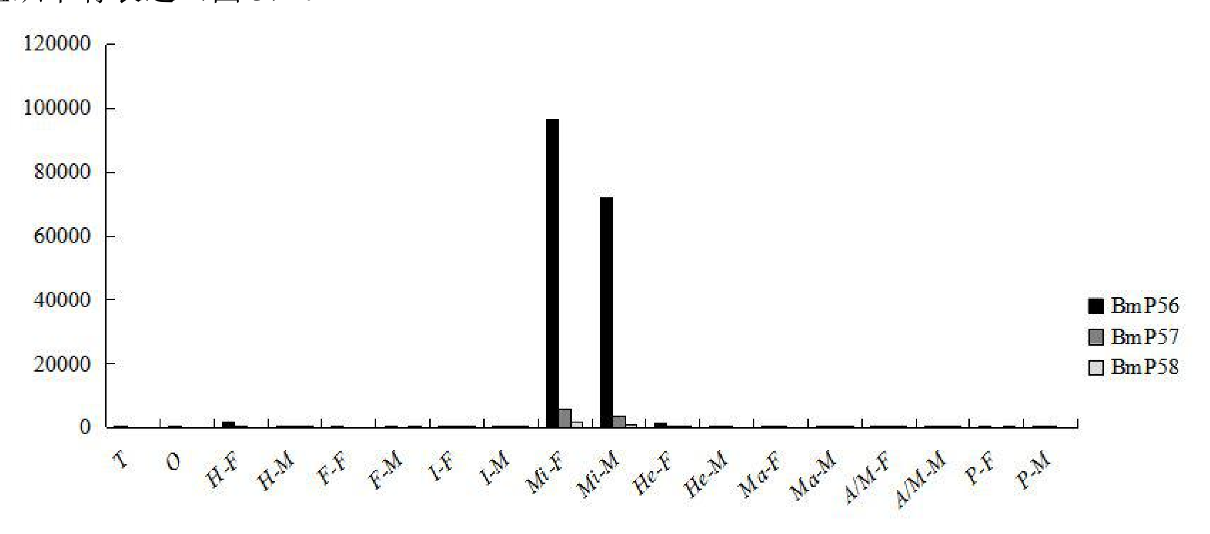


图 2 家蚕基因芯片中 3 个中肠特异表达候选基因的表达轮廓

Fig. 2 The expression profile of three midgut-specifically expressed candidate genes in silkworm gene microarray

T: testis; O: ovary; H-F: female head; H-M: male head; F-F: female fat body; F-M: male fat body; I-F: female integument; I-M: male integument; Mi-F: female midgut; Mi-M: male midgut; He-F: female hemocyte; He-M: male hemocyte; Ma-F: female malpighian tube; Ma-M: male malpighian tube; A/M-F: female anterior and middle silkgland; A/M-M: male anterior and middle silkgland; P-F: female posterior silkgland; P-M: male posterior silkgland.

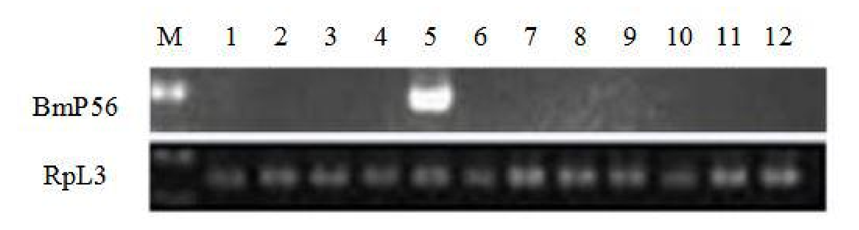


图 3 *BmP56* 在不同组织中的表达

Fig. 3 Expression profile of *BmP56* in different tissues

M: DNA marker; 1: testis; 2: ovary; 3: fat body; 4: integument; 5: midgut; 6: hemocyte; 7: malpighian tube; 8: anterior silkgland; 9:middle silkgland; 10: posterior silkgland; 11: trachea; 12:head.

2.2 上游调控序列 *P56* 的克隆

以家蚕基因组 DNA 为模板扩增 *BmP56* 的上游调控序列 *P56*，经克隆和质粒酶切检测，发现 1000 与 2000 之间的酶切条带，与目的片段大小一致（图 4），测序验证正确，

即成功克隆 *BmP56* 的上游调控序列 *P56*。

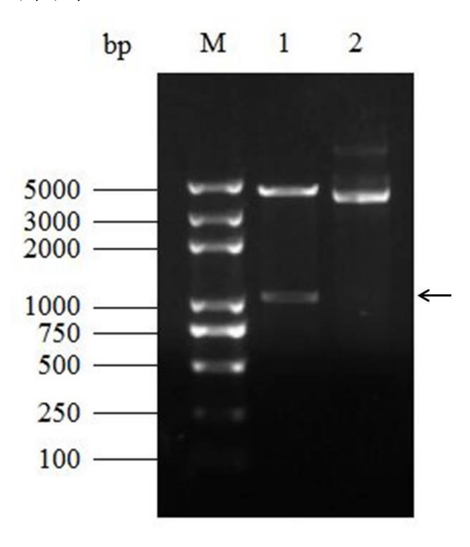


图 4　T-P56 酶切验证

Fig. 4　The digested map of T-P56 by restriction enzyme

M: trans2K plus II DNA marker; 1: The digested result of T-P56; 2: The control of plasmid T-P56.

2.3　转基因家蚕的获得

为克隆家蚕新的中肠特异启动子，首先构建由上游调控序列 *P56* 驱动 *DsRed* 表达的转基因载体 pBac[P56DsRedSV40，3×P3EGFP]。将载体注入家蚕早期胚胎，共注射 300 粒，G0 代孵出 155 头。经正常饲养至化蛾，交配制种，获得 G1 代蚕卵，在胚胎期筛选出 7 个阳性蛾圈，共 86 个阳性个体。

将 G1 代阳性个体继续饲养至化蛾。蛾期荧光观察，发现只在转基因蚕蛾眼部有绿色荧光，非转基因蚕蛾眼部没有绿色荧光（图 5），取眼部有绿色荧光的转基因蚕蛾交配制 G2 代种。

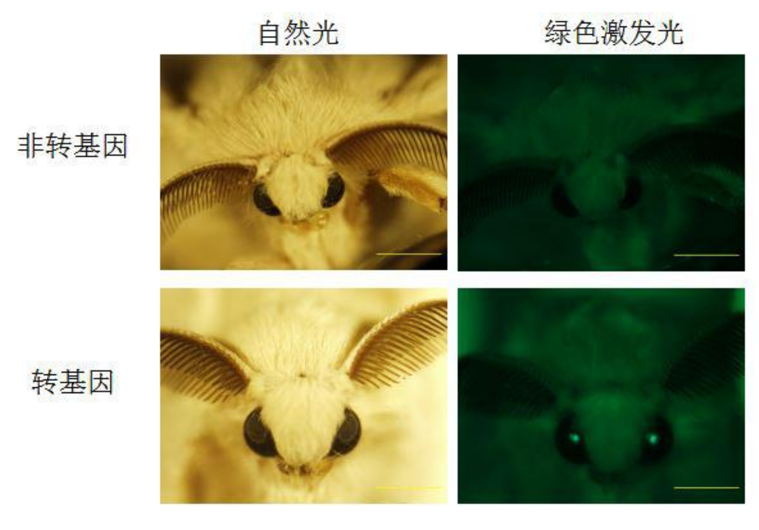


图 5　转基因阳性个体的荧光观察

Fig. 5　The fluorescent observation of transgenic silkworm

2.4　报告基因 *DsRed* 表达检测

为验证上游调控序列 *P56* 的调控能力及特性，我们检测了报告基因 *DsRed* 分别在转基因及非转基因家蚕中肠和剩余组织中的表达情况。结果如图 6 所示，*DsRed* 只在转基因家蚕中肠组织中有表达，而在转基因家蚕剩余组织、非转基因家蚕中肠组织及非转基因家蚕剩余组织中均未检测到 *DsRed* 的表达，说明上游调控序列 *P56* 能够驱动外源基因在家蚕中肠组织中特异表达。

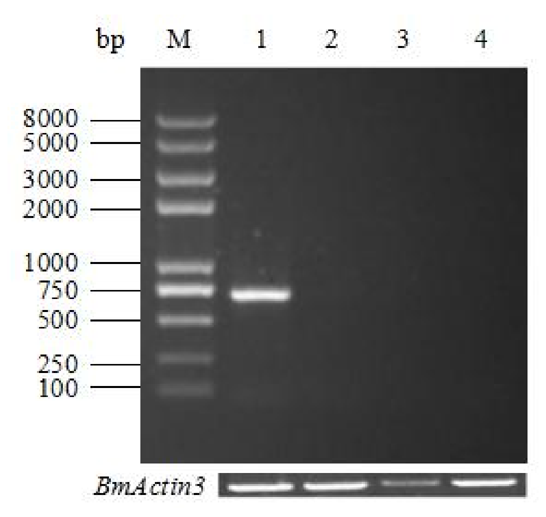


图 6　*DsRed* 基因在不同组织中的表达

Fig. 6　The expression profile of *DsRed* in different tissues

M: trans2K plus II DNA marker; 1: midgut tissue of transgenic silkworm; 2: mixed tissues of transgenic silkworm except of midgut; 3: midgut tissue of non-transgenic silkworm; 4: mixed tissue of non-transgenic silkworm except of midgut.

3 讨论

家蚕取食时，病原微生物随食物被吞下，进入肠道，要么排泄掉，要么穿过家蚕中肠围食膜感染上皮细胞。中肠是家蚕抵御病原入侵的第一道生理屏障，也是家蚕先天免疫应答及抗病研究的重要靶器官[14-16]。家蚕不同组织中存在一些特异表达的基因，这些基因往往与该组织生理功能相关[8, 17-18]。中肠特异启动子能控制外源基因在家蚕中肠组织特异表达，辅助提高家蚕的抗病能力，为中肠生理功能和免疫抗性研究提供分子工具。

本研究鉴定了 1 个新的家蚕中肠特异表达基因 *BmP56*，同时验证了该基因启动子 *P56* 可驱动外源基因在家蚕中肠组织特异表达。本研究结果，为家蚕免疫抗性及中肠生理功能研究提供新的理论基础。下一步，我们可利用该启动子构建新的实用蚕品种，以便择优选择具有更高抗性的家蚕品种，用于蚕业生产。

参考文献

[1] Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel K M, et al. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. Virology, 2004, 321(1): 154-162.

[2] Cheng Y, Wang X, Du C, et al. Expression Analysis of Several Antiviral Related Genes to BmNPV in Different Resistant Strains of Silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Science, 2014, 14: 76.

[3] Hu X, Zhu M, Wang S, et al. Proteomics analysis of digestive juice from silkworm during *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. Proteomics, 2015, 15(15): 2691-2700.

[4] Ponnuvel K M, Nakazawa H, Furukawa S, et al. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. Journal of Virology, 2003, 77(19): 10725-9.

[5] 陆改, 程廷才, 蒋亮, 等. 家蚕中肠特异启动子 *BmAPN* 的克隆及活性分析. 中国农业科学, 2012, 45(20): 4279-4287.
Lu G, Cheng T, Jiang L. Cloning and activity analysis of a midgut-specific promoter BmAPN in Silkworm (*Bombyx mori*). 2012, 45(20): 4279-4287.

[6] Jiang L, Cheng T, Dang Y, et al. Identification of a midgut-specific promoter in the silkworm *Bombyx mori*. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2013, 433(4): 542-6.

[7] Jiang L, Zhao P, Cheng T, et al. A transgenic animal with antiviral properties that might inhibit multiple stages of infection. Antiviral Research, 2013, 98(2): 171-173.

[8] Xia Q, Cheng D, Duan J, et al. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori.* Genome Biology, 2007, 8(8): R162.

[9] 钟晓武. 家蚕围食膜的蛋白质组及几丁质去乙酰化酶的功能研究. 西南大学, 2012.

Zhong X W. Proteomic analysis on peritrophic membrane and functional characterization of chitin deacetylase in silkworm, *bombyx mori*. Southwest University, 2012.

[10] Zhong X W, Wang X H, Tan X, et al. Identification and Molecular Characterization of a Chitin Deacetylase from *Bombyx mori* Peritrophic Membrane. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(2): 1946-61.

[11] Xia Q, Zhou Z, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). Science, 2004, 306(5703): 1937-40.

[12] Wang J, Xia Q, He X, et al. SilkDB: a knowledgebase for silkworm biology and genomics. Nucleic Acids Res, 2005, 33(Database issue): D399-402.

[13] 马三垣, 徐汉福, 段建平, 等. 家蚕转基因技术中若干因素对转基因效率的影响. 昆虫学报, 2009, 52(6): 595-603.

Ma S Y, Xu H F, Duan J P, et al. Effect of several factors on the transformation efficiency in the transgenic technology of silkworm, *Bombyx mori*. Acta Entomologica Sinica, 2009, 52(6): 595-603.

[14] Yue Y J, Tang X D, Xu L, et al. Early responses of silkworm midgut to microsporidium infection - A Digital Gene Expression analysis. J Invertebr Pathol, 2015, 124: 6-14.

[15] Wu S, Zhang X, He Y, et al. Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(11): 1191-1198.

[16] 王延稳, 吕志强. 家蚕肠道感染细菌后 6 种抗菌肽基因表达的变化. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2016, 44(1): 185-191.

Wang Y W, Lv Z Q. Expression of 6 antimicrobial peptide genes in silkworm, *Bombyx mori* after oral bacterial infection. Journal of Northwest A & F University, 2016, 44(1): 185-191.

[17] Yang B, Huang W, Zhang J, et al. Analysis of gene expression in the midgut of *Bombyx mori* during the larval molting stage. BMC Genomics, 2016, 17(1): 866.

[18] Deng D, Wang F, Duan X, et al. The promoter of Bmlp3 gene can direct fat body-specific expression in the transgenic silkworm,*Bombyx mori*. Transgenic Res, 2013,22(5): 1055-63.